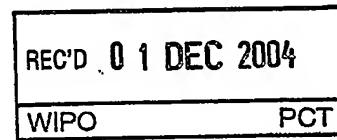


证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本



申 请 日: 2003. 09. 19

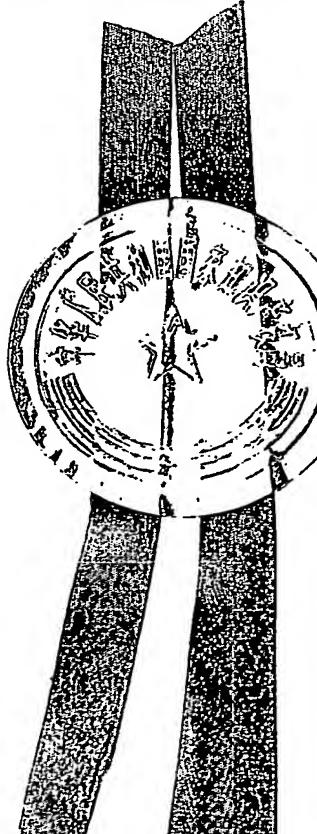
申 请 号: 03150998. 3

申 请 类 别: 发明

发明创造名称: 用于治疗更年期综合征的广防风根提取物制剂及制备方法

申 请 人: 上海药港生物技术有限公司

发明人或设计人: 黄寰



PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2004 年 10 月 22 日

权 利 要 求 书

1、一种广防风根提取物制剂，其特征在于该制剂是由广防风根提取物和药用辅料组成的各种口服制剂，其中广防风根提取物是由广防风根部经水提、浓缩后获得的浸膏，含广防风苷 A 0.10~1.50%。

2、根据权利要求 1 所述的广防风根提取物制剂，其特征在于其中所述的口服制剂为医学上可接受的各种口服剂型包括硬胶囊、软胶囊、颗粒剂、片剂或口服液。

3、根据权利要求 1 所述的广防风根提取物制剂的制备方法，其特征在于所述的广防风根提取物制剂制备包括下述步骤：

1) 取广防风根, 粉碎, 加 10 倍量的水提取两次, 每次 1-2 小时, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.01~1.08 的清膏, 喷雾干燥或真空干燥, 得提取物; 用高压液相法测定, 广防风根提取物含广防风苷 A 0.10%~1.50%;

2) 将提取物与辅料按比例混匀后, 干法或湿法制粒, 按常规方法制成各种制剂。

4、根据权利要求 3 所述的广防风根提取物制剂的制备方法，其特征在于其中所述的广防风根提取物中的广防风苷 A 的含量测定方法包括：

1) 仪器与材料:

仪器: Aglient1100 高效液相色谱仪

对照品：广防风昔 A

试剂：甲醇、乙腈、蒸馏水等所有试剂为分析纯

样品：广防风根提取物（上海药港生物技术有限公司自制）

2) 色谱条件:

色谱柱: Discovery C18 (250*4.6mm, 5um)

流动相: 乙腈: 水=27: 73

流速: 1.0ml/min 柱温: 室温

检测波长: 320nm 进样量: 20ul

3) 标准曲线

①标准储备液的制备: 精密称取对照品 4.95mg, 加甲醇超声溶解, 定量到 25ml;

②标准曲线的绘制: 精密吸取对照品储备液各 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 于 2ml 容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摆匀, 分别得浓度为 39.6ug/ml, 79.2 ug/ml, 118.8 ug/ml, 158.4 ug/ml, 198 ug/ml 的 Y1 标准液, 采用以上色谱条件, 进样 20ul。以峰面积 Y 为纵坐标, Y1 浓度 X 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=20.139X-154.35$; $R^2=0.9994$, 线形范围: 0.792~3.96ug, Y1 出峰时间为 9.55min;

4) 样品测定

对照品溶液配制: 精密称取对照品一定量, 加甲醇超声溶解, 定容, 分别吸取供试品溶液 20ul, 按上诉液相条件测定, 记录峰面积, 并用标准曲线计算 Y1 的含量;

供试液的制备: 取广防风根提取物粉末, 精密称取 170.5mg, 置于离心管中, 加水超声提取两次, 离心, 取上清液, 残渣再用水洗, 合并上清液和洗液, 定容至 10ml 容量瓶中, 进样前用 0.45μm 滤膜过滤;

取以上供试液在色谱条件下进样, 按双点校正法计算样品中所含组分的含量, 计算公式如下:

$$Y=20.139X-154.35$$

Y 为峰面积值;

X 为样品的浓度 ug/ml;

则样品中广防风苷 A 的含量为 $X*10/\text{取样量}*100\%$ 。

说 明 书

用于治疗更年期综合征的广防风根提取物制剂及制备方法

技术领域:

本发明涉及中药制药领域, 具体涉及一种用于治疗妇女更年期综合征的广防风根提取物制剂及制备方法。

背景技术:

对更年期综合征的治疗, 长期以来都是使用雌激素类制剂, 但由于激素有诸多的副作用及不良反应, 甚至可能导致癌症, 不易被广大妇女所接受。因此, 就目前来说, 在临幊上尚无较为理想的药物。

广防风, 又名防风草, 拉丁名 *Epimeredi indica*(L.) Rothmalex, 在《中药大辞典》中有记载, 为唇形科植物防风草的全草, 主要用于治疗感冒身热, 呕吐, 腹痛, 筋骨疼痛, 痘疮, 湿疹, 痔疾等; 在中华人民共和国卫生部部颁标准《中药成方制剂》第二十册的贯防感冒片, 是组方中的一味药。

本发明申请人已在中国专利申请 02110522.7 中公开了广防风根的新用途。广防风根具有改善卵巢功能和调节雌激素和孕激素的作用, 可用于制备治疗预防与雌激素、孕激素平衡失调有关的疾病的药物或保健品。

发明内容:

本发明所要解决的技术问题是在中国专利申请 02110522.7 的基础上, 进一步开发广防风根提取物制剂, 提供一种活性成份含量确切, 质量稳定的新型广防风根口服制剂。

本发明公开的广防风根提取物制剂是由广防风根提取物和药用辅料组成的各种口服制剂, 其中广防风根提取物是由广防风根部经水提、浓缩后获得的浸膏, 含广防风苷 A 0.10~1.50%。

本发明所述药用辅料为常规制剂使用的药用辅料, 所述的口服制

7
剂为医学上可接受的各种口服剂型包括硬胶囊、软胶囊、颗粒剂、片剂或口服液等。

本发明所要解决的另一技术问题是公开上述广防风根提取物制剂的制备方法和活性成份检测方法。

本发明公开的广防风根提取物制剂制备包括下述步骤：

1、取广防风根，粉碎，加10倍量的水提取两次，每次1-2小时，合并煎液，滤过，滤液浓缩至相对密度为1.01~1.08(25~30℃测)的清膏，喷雾干燥或真空干燥，得提取物；用高压液相法测定，广防风根提取物含广防风苷A 0.10%~1.50%；

2、将提取物与辅料按比例混匀后，干法或湿法制粒，按常规方法制成各种制剂。

本发明所述广防风根提取物中的广防风苷A的含量测定方法包括：

1、仪器与材料：

仪器：Aglient1100高效液相色谱仪

对照品：广防风苷A

试剂：甲醇、乙腈、蒸馏水等所有试剂为分析纯

样品：广防风根提取物（上海药港生物技术有限公司自制）

2、色谱条件：

色谱柱：Discovery C18 (250*4.6mm, 5um)

流动相：乙腈：水=27：73

流速：1.0ml/min 柱温：室温

检测波长：320nm 进样量：20ul

3、标准曲线

①标准储备液的制备：精密称取对照品4.95mg，加甲醇超声溶解，定量到25ml；

②标准曲线的绘制：精密吸取对照品储备液各0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0于2ml容量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，分别得浓度为39.6ug/ml, 79.2 ug/ml, 118.8 ug/ml, 158.4 ug/ml, 198 ug/ml的Y1标准液，采用以上色谱条件，进样20ul。以峰面积(Y)为纵坐标，Y1浓度(X)

为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=20.139X-154.35$; $R^2=0.9994$, 线形范围: 0.792~3.96ug, Y1 出峰时间为 9.55min;

4、样品测定

对照品溶液配制: 精密称取对照品一定量, 加甲醇超声溶解, 定容, 分别吸取供试品溶液 20ul, 按上诉液相条件测定, 记录峰面积, 并用标准曲线计算 Y1 的含量;

供试液的制备: 取广防风根提取物粉末, 精密称取, 置于离心管中, 加水超声提取两次, 离心, 取上清液, 残渣再用水洗, 合并上清液和洗液, 定容至 10ml 容量瓶中, 进样前用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤;

取以上供试液在色谱条件下进样, 按双点校正法计算样品中所含组分的含量, 计算公式如下:

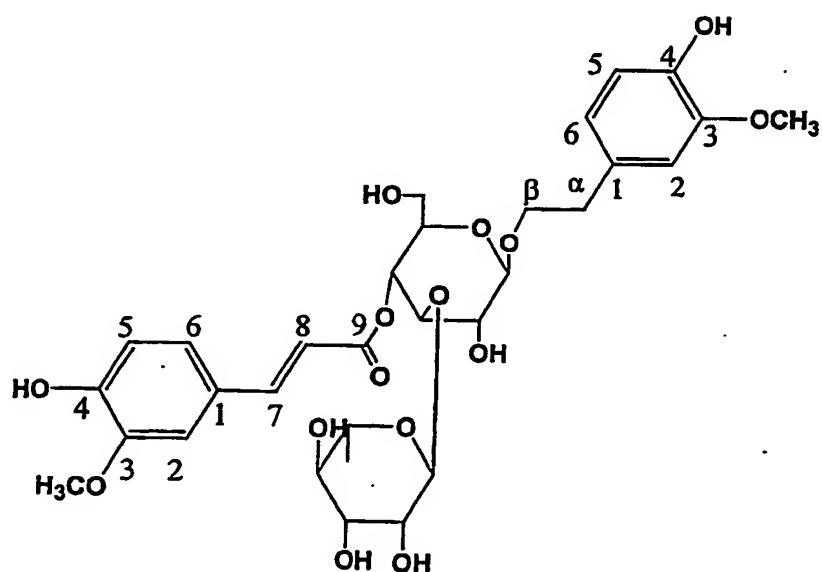
$$Y=20.139X-154.35$$

Y 为峰面积值;

X 为样品的浓度 ug/ml;

则样品中广防风苷 A 的含量为 $X*10/取样量*100\%$ 。

本发明使用的对照品广防风苷 A 是从广防风根提取物中分离纯化获得的有效成份单体, 即取广防风根提取物用正丁醇萃取, 分别上大孔树脂和 C-18 硅胶柱, 醇洗脱, 收集, 薄层检查, 合并, 回收获得的。其 HPLC 图见图 2, 其结构为:



对本发明广防风苷 A 的含量测定方法进行方法学考察:

(1) 标准曲线的建立

①标准储备液的制备: 精密称取对照品 4.95mg, 加甲醇超声溶解, 定量到 25ml;

②标准曲线的绘制: 精密吸取对照品储备液各 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 于 2ml 容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摆匀, 分别得浓度为 39.6ug/ml, 79.2 ug/ml, 118.8 ug/ml, 158.4 ug/ml, 198 ug/ml 的 Y1 标准液, 采用以上色谱条件, 进样 20ul。以峰面积 (Y) 为纵坐标, Y1 浓度 (X) 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=20.139X-154.35$; $R^2=0.9994$, 线形范围: 0.792~3.96ug, Y1 出峰时间为 9.55min

峰面积

编号	1	2	3	4	5
进样浓度 (ug/ml)	39.6	79.2	118.8	154.4	198
峰面积 (mAU)	612.811	1472.17	2234.391	3036.277	3802.776

Y1 标准曲线见图 1。

(2) 精密度实验

精密吸取浓度为 0.198mg/ml 的 Y1 对照液, 在以上同样条件下, 连续进样 6 次, 作精密度考察:

试验号	峰面积	X	RSD (%)
1	3802.776	3815.223	0.824
2	3806.568		
3	3879.024		
4	3796.254		
5	3802.456		
6	3804.259		

结果表明: 方法的精密度良好。

(3) 稳定性试验

取对照品溶液, 分别在 0, 4, 8, 12 小时内测定 Y1 峰面积, 每次进样 20ul

试验号	1	2	3	4
峰面积	3785.21	3749.56	3802.54	3855.23
平均值	3798.135			
RSD (%)	1.16			

(4) 重现性试验

精密称取上述同一批样品 5 份，按照“样品含量测定”项下方法制备供试液，按上述方法进样 20ul，测定供试液中 Y1 峰面积。

试验号	1	2	3	4	5
峰面积	522.824	531.245	536.258	522.356	514.252
平均值	525.387				
RSD (%)	1.63				

(5) 加样回收率实验

精密称取以测定含量的样品，取 Y1 对照品储备液，分别精密加入适量该对照品溶液，照“样品含量测定”项下操作，在相同液相条件下测定 Y1 含量。

编号	样品 Y1 的量/ug	加入 Y1 的量/ug	测定 Y1 的量/ug	回收率	平均回收率	RSD (%)
1	38.643	31.68	68.495	97.400	98.292	5.26
2	38.643	31.68	66.455	94.500		
3	38.643	39.6	72.922	93.199		
4	38.643	39.6	74.8	95.600		
5	38.643	47.52	88.362	102.552		
6	38.643	47.52	91.764	106.500		

上述试验证明，本发明广防风根提取物质量检测方法准确、稳定。

本发明广防风根制剂不含激素，服用后不需要加服孕激素来预防不良反应，临床疗效确切，质量稳定、可控，安全性好，特别适合更年期妇女长期服用。同时，也为那些需要雌激素治疗，但又有激素禁忌症的病人提供了一条新的途径。

附图说明：

图 1 Y1 标准曲线

图 2 广防风苷 A 对照品 HPLC 图

图 3 广防风根提取物 HPLC 图

具体实施方式:

实施例 1 广防风根提取物制备及含量测定.

A、取广防风根，粉碎，加 10 倍量的水，煎煮 2 小时，滤液待用，残渣加 8 倍量水，煎煮 2 小时，滤过，合并滤液，滤液浓缩，喷雾干燥或真空干燥，得广防风根提取物。

B、含量测定.

1、仪器与材料:

仪器：Aglient1100 高效液相色谱仪

对照品：广防风苷 A

试剂：甲醇、乙腈、蒸馏水等所有试剂为分析纯

样品：广防风根提取物（上海药港生物技术有限公司自制）

2、色谱条件:

色谱柱：Dsicover C18 (250*4.6mm, 5um)

流动相：乙腈：水=27: 73

流速：1.0ml/min 柱温：室温

检测波长：320nm 进样量：20ul

3、标准曲线

①标准储备液的制备：精密称取对照品 4.95mg，加甲醇超声溶解，定量到 25ml；

②标准曲线的绘制：精密吸取对照品储备液各 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 于 2ml 容量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，分别得浓度为 39.6ug/ml, 79.2 ug/ml, 118.8 ug/ml, 158.4 ug/ml, 198 ug/ml 的 Y1 标准液，采用以上色谱条件，进样 20ul。以峰面积 (Y) 为纵坐标，Y1 浓度 (X) 为横坐标，进行线性回归，得回归方程 $Y=20.139X-154.35$; $R^2=0.9994$ ，线形范围：0.792~3.96ug，Y1 出峰时间为 9.55min；

4、样品测定

对照品溶液配制：精密称取对照品一定量，加甲醇超声溶解，定容，分别吸取供试品溶液 20ul，按上液相条件测定，记录峰面积，并用标准曲线计算 Y1 的含量；见图 2

供试液的制备：取广防风根提取物粉末，精密称取 176.66mg，

置于离心管中，加水超声提取两次，离心，取上清液，残渣再用水洗，合并上清液和洗液，定容至 10ml 容量瓶中，进样前用 0.45μm 滤膜过滤；

取以上供试液在色谱条件下进样，见图 3，按双点校正法计算样品中所含组分的含量：

$$Y=383.380$$

$$\text{根据 } Y=20.139X-154.35 \text{ 计算得 } X=26.70\text{ug/ml}$$

则样品中广防风苷 A 的含量为 $X*10/\text{取样量}*100\% = 0.15\%$ 。

实施例 2 颗粒剂的制备

处方：

广防风根提取物	150g
乳糖	50g
硬脂酸镁	2g

方法：将实施例 1 方法获得的广防风根提取物与乳糖等辅料混匀，过筛，制颗粒，再过筛筛选，即得。含广防风苷 A 0.17%。

实施例 3

处方：

广防风根提取物	130g
乳糖	70g
硬脂酸镁	1g

方法：将实施例 1 方法获得的广防风根提取物与乳糖等辅料混匀，过筛，制颗粒，再过筛筛选，即得。含广防风苷 A 0.13%。

实施例 4 胶囊剂的制备

处方：

广防风根提取物	110g
乳糖	90g
硬脂酸镁	1g

方法：将实施例 1 方法获得的广防风根提取物与乳糖等辅料混匀，过

60 目筛，制颗粒，再过筛筛选，装胶囊即得。含广防风苷 A 0.27%。

实施例 5 片剂的制备

处方：

广防风根提取物	230g
微晶纤维素	20g
羧甲基淀粉钠	3g
聚乙烯吡咯烷酮	1g
滑石粉	1g
硬脂酸镁	1g

方法：称取微晶纤维素、羧甲基淀粉钠等辅料置于研钵中混合，加入实施例 1 方法获得的广防风根提取物，于振动研磨机中，高速研磨数分钟，取出。制粒，进行干燥，整理，加入少量硬脂酸镁润滑剂，压片，包薄膜衣，即得。含广防风苷 A 0.23%。

实施例 6 片剂制备

处方：

广防风根提取物	300g
微晶纤维素	26g
羧甲基淀粉钠	2.8g
聚乙烯吡咯烷酮	2.8g
滑石粉	2.8g
硬脂酸镁	1g

方法同实施例 5。含广防风苷 A 0.22%。

说 明 书 附 图

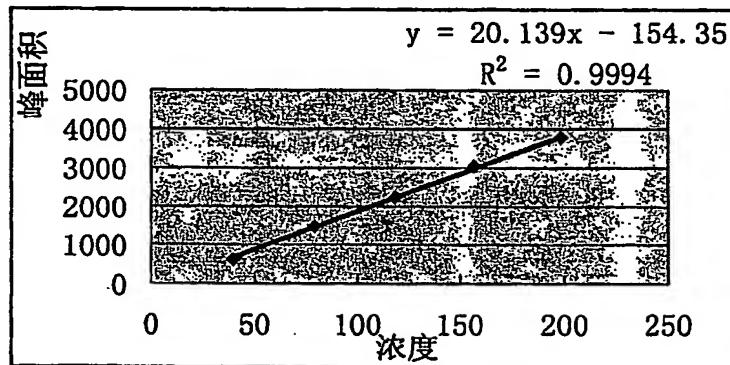
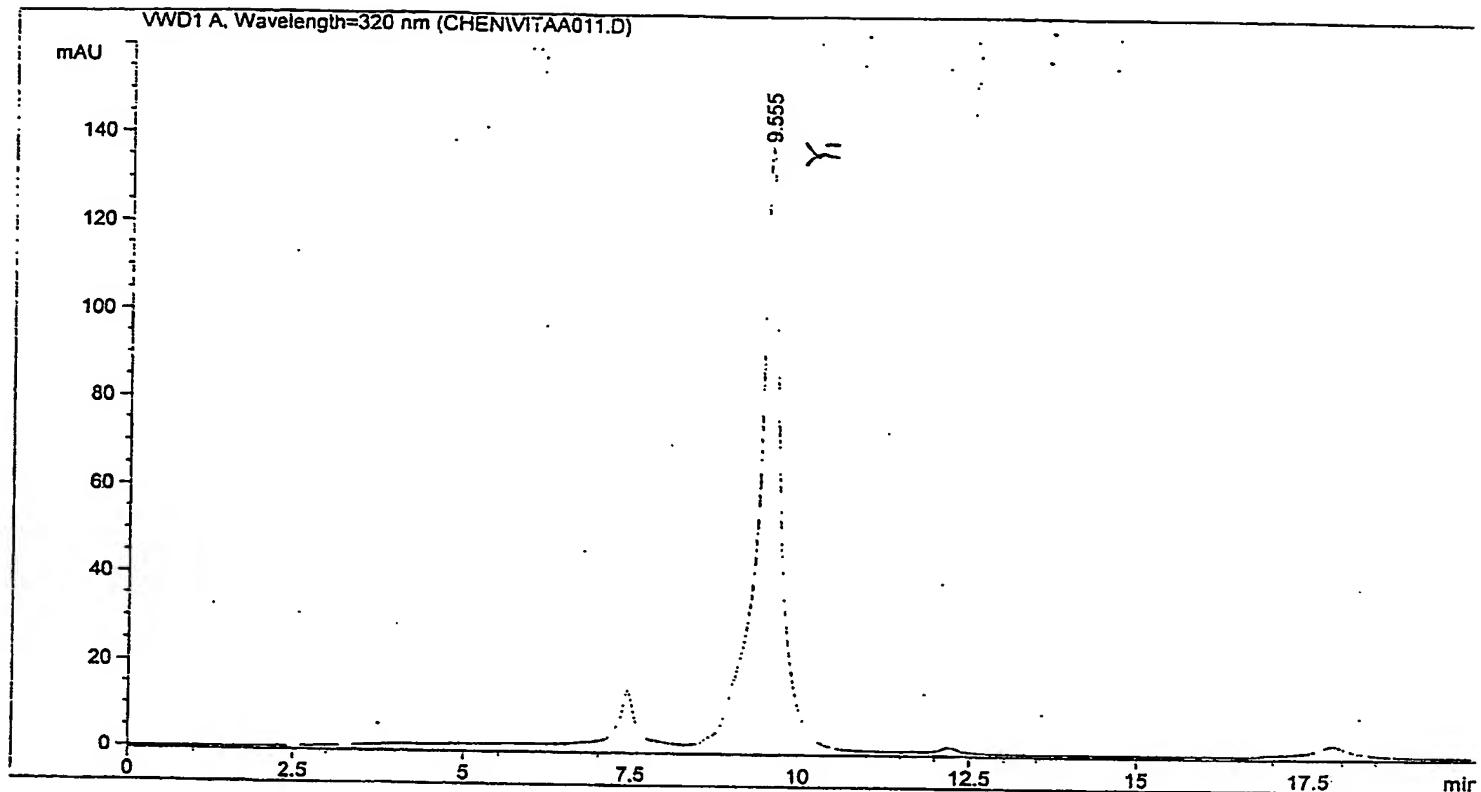


图 1

03-10-06

15



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

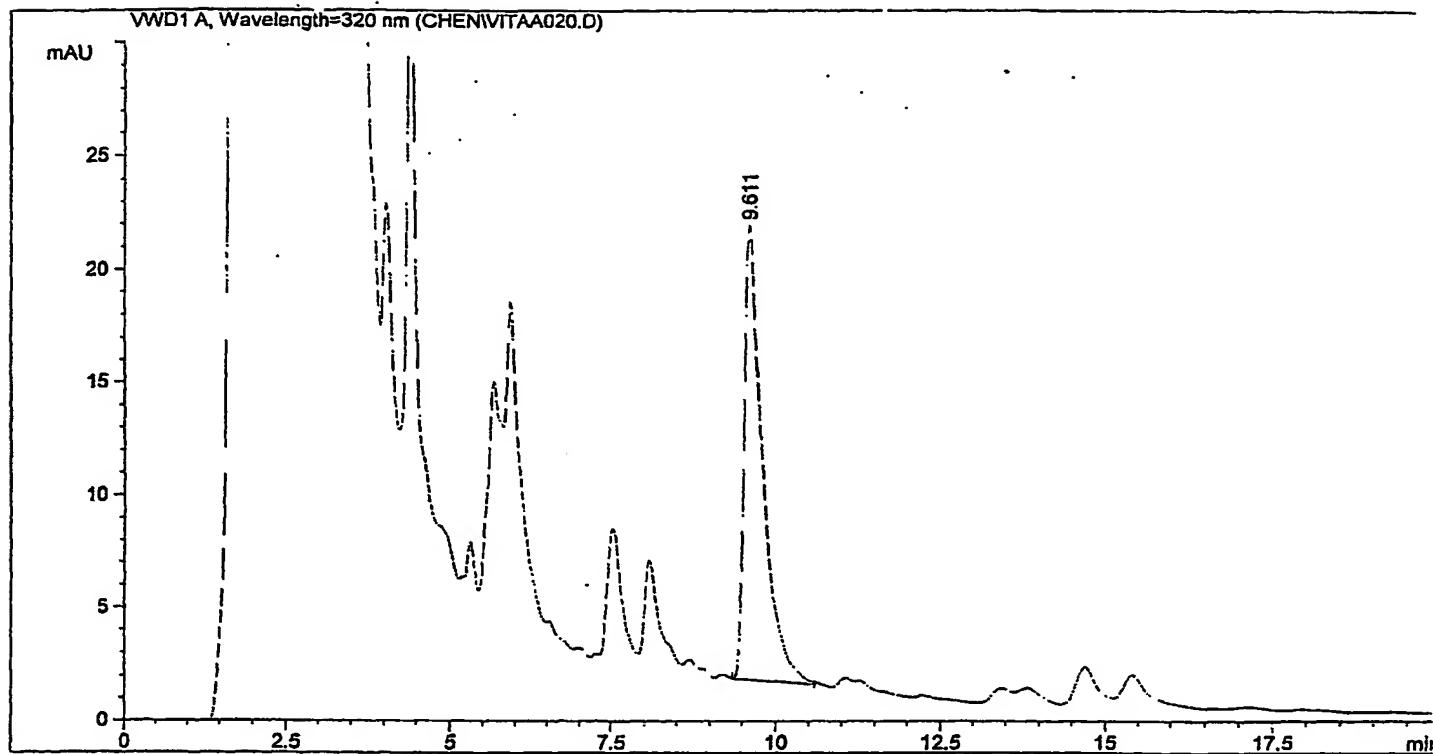
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k' mAU	Area *s	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates 7644	Resol ution	Select ivity
9.555	-	3789.69067	137.40930	1.57	0.2572	-	-	-

图 2

003-10-06

16



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height *s	Area [mAU]	Area %
1	9.611	VB	0.2642	383.37985	20.14884	100.0000	

Totals : 383.37985 20.14884

图 3